

Isolasi dan Identifikasi Khamir Indigenus Pada Fermentasi Spontan Biji Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) di Kabupaten Bantaeng

Isolation And Identification Of Indigenous Yeast In Spontaneous Fermentation Of Robusta Coffee Beans in Bantaeng

A. Nurul Hikmah*, Program Studi Pendidikan Teknologi Pertanian, Universitas Negeri Makassar, email: andinurulhikmah1998@gmail.com

Muhammad Rais, Program Studi Pendidikan Teknologi Pertanian, Universitas Negeri Makassar, email: m.rais@unm.ac.id

Andi Sukainah, Program Studi Pendidikan Teknologi Pertanian, Universitas Negeri Makassar, email: andisukainah@yahoo.com

Reski Praja Putra, Program Studi Pendidikan Teknologi Pertanian, Universitas Negeri Makassar, email: reski.prajaputra@unm.ac.id

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi khamir indigenus pada fermentasi spontan biji kopi robusta asal Kabupaten Bantaeng dengan interval waktu 0, 3, 6, 9, 24, 48 dan 72 jam serta menguji aktivitas enzim. Parameter pengamatan yang digunakan untuk mengidentifikasi isolat khamir yaitu uji morfologi yang terdiri dari pengamatan makroskopis dan mikroskopis, uji biokimia yang terdiri dari pengujian kemampuan fermentasi isolat khamir pada media karbohidrat, dan uji pertumbuhan isolat khamir pada media glukosa 50%. Selanjutnya, aktivitas enzim (*selulase* dan *pektinase*) yang dihasilkan oleh isolat khamir terpilih diuji secara kualitatif. Hasil pengujian secara makroskopis dan mikroskopis menunjukkan ada 24 isolat khamir yang berhasil yang diisolasi. Selanjutnya isolat diuji kemampuannya dalam memfermentasi substrat karbohidrat. Hasil menunjukkan semua isolat memfermentasi glukosa, 9 isolat memfermentasi sukrosa dan 5 isolat yang memfermentasi laktosa, dan 13 isolat yang mampu tumbuh pada media glukosa 50%. Isolat khamir yang akan dikembangkan sebagai starter fermentasi kopi adalah isolat yang diisolasi pada waktu fermentasi 24 jam. Oleh karena itu, 7 isolat khamir diuji kemampuannya dalam menghasilkan enzim selulase dan pektinase. Hasil pengujian menunjukkan 6 isolat memproduksi selulase dan 4 isolat menghasilkan pektinase. Isolat KT24I3, KT24I4, KT24I7 layak dikembangkan sebagai starter, karena ketiga isolat ini mampu menghasilkan enzim *selulase* dan *pektinase*.

Kata Kunci: Isolasi, Khamir, Fermentasi, Biji Kopi

Abstract

This research to isolate and identify indigenous yeasts in spontaneous fermentation of robusta coffee beans from Bantaeng Regency at time intervals of 0, 3, 6, 9, 24, 48 and 72 hours and to test enzyme activity. The observation parameters used identify yeast isolates are morphological tests consisting of macroscopic and microscopic observations, biochemical tests consisting testing the fermentation ability yeast isolates on carbohydrate media, and growth tests yeast isolates on 50% glucose media. Next, enzyme activities (cellulase and pectinase)

produced by the selected yeast isolates were tested qualitatively. The results of macroscopic and microscopic testing showed that 24 successful yeast isolates were isolated. Next, isolate was tested for its ability ferment carbohydrate substrates. The results showed that all isolates fermented glucose, 9 isolates fermented sucrose and 5 isolates fermented lactose, 13 isolates were able grow on 50% glucose media. The yeast isolate that will be developed as coffee fermentation starter an isolate isolated during 24 hours of fermentation. Therefore, 7 yeast isolates were tested for their ability to produce cellulase and pectinase enzymes. Test results showed that 6 isolates produced cellulase and 4 isolates produced pectinase. Isolates KT24I3, KT24I4, KT24I7 suitable development starters, because these three isolates are capable of producing cellulase and pectinase.

Keywords: Isolation, Yeast, Fermentation, Coffee Beans

Pendahuluan

Kopi merupakan komoditas perkebunan yang bernilai tinggi dibandingkan tanaman industri perkebunan lainnya (Rahardjo, 2012). Kopi robusta termasuk salah satu komoditas unggulan perkebunan yang berkontribusi terhadap penghidupan masyarakat di Kabupaten Bantaeng. Produksi kopi di Banten terhambat oleh rendahnya harga kopi, yang menyebabkan berkurangnya insentif petani untuk mengelola tanaman mereka secara efektif. Selain itu, teknik pengelolaan pascapanen yang digunakan masih belum sempurna. (Khususiyah *et al.*, 2012).

Proses fermentasi dapat memacu terjadinya proses kimiawi untuk membentuk precursor citarasa biji kopi yaitu asam organik, asam amino dan gula reduksi (Lin, 2010). Dengan melakukan pengolahan kopi secara pengolahan basah dapat menghasilkan citarasa yang lebih dari pada penanganannya kopi secara kering (Murthy *et al.*, 2011)

Tujuan fermentasi pada kopi adalah untuk mengubah secara enzimatis molekul gula yang terdapat pada lapisan lendir antara eksokarp dan endokarp menjadi alkohol dengan bantuan mikroorganisme dan oksigen yang berasal dari atmosfer.

Kemanjuran proses fermentasi biji kopi sebagian besar dipengaruhi oleh populasi mikroba yang berkembang biak selama fermentasi (Yusianto dan Nugroho, 2014).

Ragi yang berasal dari biji kopi yang difermentasi memfasilitasi pembuangan sisa lendir yang menempel pada permukaan perkamen biji kopi secara efisien, sehingga menyederhanakan proses pembersihan sisa lendir. Genera khamir yang paling banyak ditemukan pada fermentasi biji kopi adalah *Saccharomyces* sp., *Pichia* spp., *Kluyveromyces* spp., dan *Candida* spp. (Evangelista *et al.*, 2014).

Salah satu upaya peningkatan kualitas biji kopi robusta dapat dilakukan dengan mengendalikan fermentasi menggunakan isolat murni (starter). Pengembangan starter dari isolat khamir indigenus kopi robusta diharapkan dapat meningkatkan mutu kopi robusta. Oleh karena itu, kajian isolasi dan identifikasi khamir indigenus yang terlibat selama proses fermentasi spontan kopi robusta perlu dilakukan. Isolasi dilakukan untuk memisahkan isolat khamir dari substrat aslinya sehingga menghasilkan kultur murni yang dapat dijadikan sebagai pengembangan starter khamir indigenus pada fermentasi kopi.

Metode Penelitian

Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober sampai Desember 2020 di Laboratorium Pendidikan Teknologi Pertanian yang terletak di Fakultas Teknik Universitas Negeri Makassar.

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung Durham, timbangan analitik Kern ABJ 220-4NM, labu ukur, gelas ukur, korek api, bunsen, bola karet, pipet ukur, mikropipet, botol semprot, stir bar, hot plate, oven, laminar air flow, autoclave LDJ model Gea YX-24, mikroskop binokular, tabung jarum, labu erlenmeyer dan berbagai macam benda kaca.

Penelitian ini menggunakan bahan kopi Robusta Kabupaten Bantaeng, PDA [MERCK], asam tartarat, NaCl 0,85%, spiritus, alumunium foil, dan kapas, alkohol 70%, *methylene blue*, minyak emersi, akuades, glukosa, laktosa, sukrosa, *conge red*, *acid fuchin*, NB [MERCK], *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) dan Pektin.

Prosedur Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa tahapan, tahap awal adalah sterilisasi ruangan dan peralatan, tahapan pembuatan media isolasi yang akan digunakan dan tahapan proses fermentasi spontan biji kopi robusta, serta tahapan isolasi khamir dan tahap kedua yaitu melakukan identifikasi isolat khamir.

Tahap Pertama

1. Sterilisasi Ruangan dan Peralatan

Ruangan Laminar Air Flow (LAF) dilakukan pembersihan menggunakan

larutan alkohol 70%, dilanjutkan dengan sterilisasi menggunakan lampu UV dengan durasi 30 menit. Alat-alat tersebut direndam dalam larutan air sabun dan selanjutnya dibilas dengan air suling.

2. Pembuatan Media Isolasi

Pembuatan media Acid Potato Dextrose Agar (APDA) dilakukan dengan mengikuti petunjuk yang tertera pada label media PDA. Caranya termasuk menakar 39 gram Potato Dextrose Agar, mencampurkannya dengan 1 liter air suling, dan menambahkan 10 gram asam tartarat. Komponen diaduk menggunakan pengaduk magnet sambil dipanaskan di atas hot plate. Media menjalani sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121oC dengan durasi 15 menit. Selanjutnya, masukkan 10% asam tartarat steril. Selanjutnya media sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Selanjutnya media disiapkan untuk keperluan etsa isolat khamir.

3. Proses Fermentasi Spontan Biji Kopi Robusta

Tahap awal pengolahan 7 kg buah kopi Robusta merah dilakukan dengan pemisahan ranting, daun, kerikil, dan bahan lain yang tidak diinginkan. Buah kopi yang digunakan adalah buah kopi yang berwarna merah karena mengandung banyak lendir yang dapat digunakan oleh khamir sebagai sumber karbohidrat pada proses fermentasi. Setelah biji kopi Robusta dipisahkan, dilakukan proses pulping untuk memisahkan kulit dan bijinya. Rendemen yang dicapai kurang lebih 600 gram biji kopi per kilogram buah kopi. Biji kopi mengalami proses perendaman dalam air untuk membersihkannya, sehingga biji kopi yang mengapung dapat dipisahkan. Floaters dalam biji kopi menunjukkan kerusakan atau cacat. Biji kopi yang masih terbungkus

lendir (daging buah) selanjutnya difermentasi dengan cara direndam dalam air murni dengan perbandingan 1:1. Proses ini dilakukan dengan menggunakan wadah plastik ziplock dengan durasi 0, 3, 6, 9, 24, 48, dan 72 jam.

4. Perhitungan Total Khamir

Media PDA cair sebanyak 15-20 ml dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga mengeras. Kemudian, 1 ml sampel yang telah diencerkan dimasukkan ke dalam cawan Petri yang berisi media PDA padat dan diaduk rata. Proses inkubasi dilakukan pada suhu 25°C selama 24 jam. Koloni ragi dihitung setelah masa inkubasi 24 jam (Maturin & Peeler, 2001).

Rumus perhitungan total mikroba dan kapang khamir (SNI,2006)

$$\text{Total khamir} = \frac{\Sigma c}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times (d)}$$

Keterangan

Σc = adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri,

n_1 = adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung,

n_2 = dalah jumlah petri dari pengenceran kedua,

d = adalah pengenceran pertama yang dihitung

5. Isolasi Kultur Khamir

Cairan hasil fermentasi spontan biji kopi robusta yang telah disiapkan, Satu mililiter diekstraksi dan selanjutnya diencerkan hingga konsentrasi 10 pangkat negatif 6. Selanjutnya diperoleh volume 0,1 ml air suling steril dan didistribusikan secara merata ke media APDA dalam keadaan steril. Media kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam. Selanjutnya isolat hasil isolasi dimurnikan kembali dengan cara distreak kembali pada medium

agar dalam tabung reaksi hingga diperoleh isolat murni (Okwulehie, 2010).

Tahap kedua

1. Identifikasi Makroskopis dan Mikroskopis.

Identifikasi makroskopis dilakukan dengan ciri-ciri morfologi koloni diantaranya: bentuk, warna, elevasi, permukaan, tepian (Kreger, dalam Anggrayeni *et al*, 2019). Sampel ragi diidentifikasi secara mikroskopis dengan proses pewarnaan menggunakan metilen biru. Satu lingkaran kultur tunggal diekstraksi dari masing-masing sampel ragi dan ditempatkan pada kaca objek yang telah dibasahi dengan air suling. Kaca objek kemudian diwarnai dengan metilen biru dan ditutup dengan minyak imersi. Sediaan diperiksa menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x (Kreger, dalam Anggrayeni *et al*, 2019).

2. Uji Fermentasi Karbohidrat (glukosa, sukrosa dan laktosa) (Atlas, 2004).

Media fermentasi karbohidrat dibuat dengan menggunakan dasar buku Atlas tahun 2004, dengan beberapa perubahan. Untuk membuat larutan media fermentasi karbohidrat 1000 ml, diperlukan 10 gram pepton, 5 gram NaCl, 3 gram ekstrak daging, 50 ml larutan karbohidrat, dan 10 ml indikator Andrade. Untuk menyiapkan media fermentasi, encerkan semua bahan kecuali larutan karbohidrat dengan 990 ml air suling. Pertama, pastikan komposisi media fermentasi seragam. Kemudian panaskan media fermentasi dalam labu Erlenmeyer hingga terjadi perubahan nyata dan berubah warna menjadi merah.

Untuk menyiapkan 100 ml indikator Andrade diperlukan 0,1 gram asam fuchsin dan 16 ml larutan natrium hidroksida dengan konsentrasi 1 normal (1 N). Selanjutnya,

campurkan komponen tersebut dengan air suling. Untuk menyiapkan larutan karbohidrat 100 ml untuk uji fermentasi, encerkan 10 g gula pilihan, yang berfungsi sebagai sumber karbohidrat, dengan air suling dalam labu takar 100 ml. Gula yang digunakan dalam penelitian ini adalah glukosa, sukrosa, dan laktosa. Larutan karbohidrat disterilkan menggunakan proses autoklaf pada suhu 121 derajat Celcius.

Uji fermentasi karbohidrat dilakukan dengan memasukkan 10 ml campuran fermentasi karbohidrat merah ke dalam tabung reaksi yang telah berisi tabung Durham. Selanjutnya, tabung reaksi diaduk perlahan untuk menjamin bahwa media fermentasi memenuhi tabung Durham sepenuhnya. Selanjutnya, tabung reaksi ditutup rapat dan disterilisasi dalam autoklaf. Setelah media mencapai suhu yang lebih rendah, tepat 0,5 ml larutan karbohidrat steril dimasukkan ke dalam setiap tabung.

3. Uji *Glucose Yeast extract Peptone* (GYP 50%)

Larutan medium GYP dibuat dengan melarutkan 500 gram glukosa, 5 gram peptone, dan 5 gram yeast extract dalam 1000 ml air suling. Larutan yang dihasilkan mempunyai kandungan glukosa 50%. Media selanjutnya distandarisasi dan disterilkan menggunakan autoklaf, Selanjutnya tuang medium GYP steril ke dalam cawan petri 20 ml dan tunggu hingga memadat (Ali *et al.*, 2014)

4. Uji Potensi Enzim Isolat Khamir

a. Enzim selulase, media pengujian aktivitas *selulase* dibuat dari 1% *Carboxy Methyl Cellulosa* (CMC) ditambah 1% PDA. Isolat khamir kemudian diinokulasi dengan menambahkan 0,1 % indikator Congo red ke dalam media

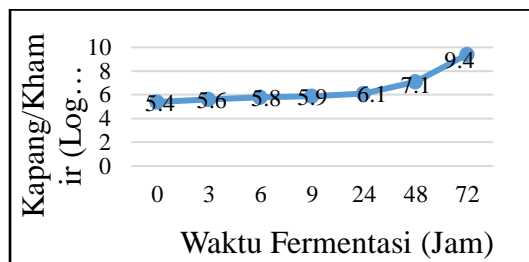
tersebut dengan cara digoreskan, Media selanjutnya dikultur selama 24 jam pada suhu kamar. Penilaian kemampuan degradasi selulase ditentukan dengan mengamati perubahan warna pada media yaitu dari merah menjadi kuning (Modifikasi Setya *et al.*, 2018).

b. Enzim pektinase Media untuk menguji aktivitas pektinase, , dibuat dari 1% pektin dan 1% PDA, indikator congo red 0,1% diteteskan ke dalamnya, dan media digores untuk menginokulasi solat khamirTeks pengguna adalah satu titik. Media dikultur selama 24 jam pada suhu kamar. Penilaian kemampuan degradasi pektinase ditentukan dengan mengamati perubahan warna medium dari merah menjadi kuning (Modifikasi Setya *et al.*, 2018).

Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan Koloni Khamir pada Media APDA

Upaya dalam memperoleh isolat khamir pada biji kopi robusta dengan menginokulasikan cairan fermentasi terlebih dahulu ke media pengenceran, Selanjutnya, pindahkan bahan ke dalam dua cawan petri terpisah untuk diduplikasi. Tuangkan media APDA ke dalam setiap cawan petri yang berisi sampel dan inkubasi selama 48 jam. Pengamatan dan perhitungan koloni untuk khamir dilakukan melihat kurva pertumbuhan kapang khamir selama proses fermentasi biji kopi robusta. Pertumbuhan koloni khamir disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan Khamirp

Hasil menunjukkan pertumbuhan koloni khamir indigenus selama 72 jam Proses fermentasi spontan terdiri dari dua tahap yaitu fase lag dan fase log. Fase lag khamir indigenus terjadi pada waktu fermentasi jam ke-0 hingga jam ke-9, yaitu pada kisaran 5,4-5,9 Log CFU/g. Fase lag terjadi karena isolat khamir pada awal fermentasi masih melakukan adaptasi terhadap lingkungannya. Lamanya fase adaptasi dipengaruhi oleh medium dan lingkungan pertumbuhan, jumlah inoculum. Tahap selanjutnya adalah fase logaritmik, dimana pertumbuhan khamir terjadi dengan sangat cepat. Hasil analisis pertumbuhan isolat khamir menunjukkan fase pertumbuhan awal log terjadi pada fermentasi jam ke-24, yaitu terjadi peningkatan jumlah koloni hingga mencapai 6.1 Log CFU/g. Kurva pertumbuhan khamir indigenus masih memasuki fase log hingga fermentasi jam ke-72, jumlah khamir pada waktu fermentasi ini meningkat hingga 9,4 Log CFU/g dibandingkan jumlah awal khamir. “Selama fase logaritmik, mikroorganisme mengalami pembelahan yang cepat dan terus menerus. Laju pertumbuhan pada fase ini sangat dipengaruhi oleh medium tempat tumbuh seperti pH dan kandungan nutrisi, serta kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembaban udara (Suprihatin, 2010)

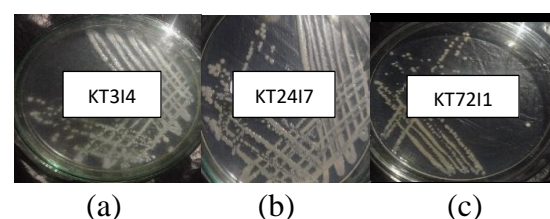
Karakteristik Makroskopis, Mikroskopis, Uji Fermentasi Karbohidrat Dan Uji Glukosa 50%

Ragi, yang secara ilmiah disebut *Saccharomyces cerevisiae*, merupakan jamur uniseluler yang terlalu kecil untuk dilihat dengan mata telanjang dan tidak memiliki flagela (Subandi, 2014). Ragi yang berasal dari biji kopi yang difermentasi

membantu menghilangkan sisa lendir yang ada di permukaan lapisan luar biji kopi. Identifikasi khamir dapat dilakukan melalui pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis, serta dengan melakukan fermentasi karbohidrat dan uji glukosa 50%. Hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 1.

a. Uji Makroskopis Isolat Khamir

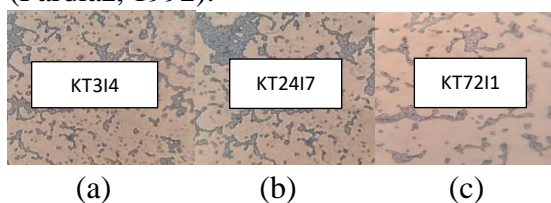
Isolat khamir yang diidentifikasi secara makroskopis memiliki bentuk yang bulat (Tabel 1) warna isolat khamir yang diperoleh beranekaragam. Umumnya isolat khamir memiliki warna putih susu, dan beberapa isolat khamir memiliki warna putih krem, putih kekuningan dan putih kecoklatan. Isolat khamir memiliki elevasi yang rata dan timbul, semua isolatnya memiliki permukaan yang mengkilap dengan tepi isolat khamir yang dihasilkan berbentuk halus dan rata. Kecuali, isolat khamir KT3I4 yang memiliki tepi yang berombak. Hasil pengamatan makroskopis menunjukkan isolat khamir memiliki bentuk yang bulat berwarna putih kecoklatan, eleasi timbul, permukaan yang mengkilap dan tepian yang rata. Menurut Kurtzman dan Fell (2011), sebagian besar ragi memiliki warna putih hingga krem, dengan sedikit warna kecoklatan. Koloni ragi dapat menunjukkan banyak karakteristik permukaan, seperti mengkilap atau kusam, halus, kasar, tersektor, terlipat, bergerigi, atau berbulu. Koloni ragi memiliki elevasi datar dengan bagian tengah cekung, serta tonjolan berbentuk kubah atau kerucut. Pinggiran koloni ragi memperlihatkan pinggiran yang bergelombang, melengkung, terkikis, atau tertutup hifa.



Gambar 1. Hasil pengamatan makroskopis a) KT3I4, b) K24I7, c) KT72I1

b. Uji Mikroskopis Isolat Khamir

Hasil identifikasi isolat khamir secara mikroskopis menunjukkan semua isolat khamir yang dihasilkan memiliki bentuk sel yang bulat (Tabel 1). Pengamatan ini dilakukan melalui pewarnaan sel menggunakan *methylen blue*. Isolat khamir yang telah diberi pewarnaan disajikan pada Gambar 2. Bentuk sel khamir bervariasi yaitu bulat, lonjong, silinder atau berbentuk batang, segitiga melengkung, berbentuk botol, bentuk apikulat, atau berbentuk lemon, membentuk pseudomiselium (Fardiaz, 1992).



Gambar 2. Hasil Pewarnaan a) KT314, b) KT2417, c) KT7214 Menggunakan *Methylen Blue*

c. Uji Fermentasi Karbohidrat (Glukosa, Sukrosa, Laktosa)

Uji fermentasi karbohidrat dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat khamir dalam memanfaatkan sumber karbon, pengujian ini menggunakan jenis karbon glukosa, sukrosa dan laktosa. Hasil menunjukkan semua isolat khamir mampu memanfaatkan glukosa sebagai sumber karbon, 9 isolat memfermentasi sukrosa, dan 5 isolat yang memfermentasi laktosa (Tabel 1). Hasil pengujian juga menunjukkan ada 12 isolat khamir yang mampu memfermentasi sukrosa dan laktosa yaitu isolat KT313 dan KT7211.

Gambar 3 dengan jelas menampilkan transisi warna yang nyata, bergeser dari merah ke kuning. Kapasitas fermentasi isolat dapat diketahui dengan mengamati perubahan warna pada media tanam. Setelah inkubasi, rona asli mengalami transisi dari merah menjadi kuning. Peralihan ke rona

kuning merupakan hasil dari kehadiran Indikator Andrade. Peranan Indikator Andrade pada media fermentasi karbohidrat adalah sebagai indikator pH. Indikator Andrade dapat digunakan untuk mendeteksi perubahan karbohidrat. Ketika ragi memetabolisme karbohidrat, mereka diubah menjadi asam organik, menyebabkan penurunan pH dan perubahan warna media menjadi kuning. Transisi dari warna merah ke kuning menandakan respon yang baik pada medium, menunjukkan bahwa sel-sel ragi menghasilkan asam, sehingga terjadi pergeseran pH media ke arah asam (Harley & Prescott, 2002).

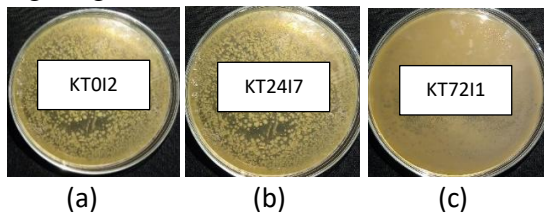


Gambar 3. Perubahan Warna Sebagai Hasil Fermentasi

d. Uji Pertumbuhan 50% Glukosa

Hasil identifikasi uji pertumbuhan 50% glukosa yang disajikan pada Tabel 1 diperoleh data bahwa setelah dilakukan pengujian pertumbuhan glukosa 50%, terdapat 13 isolat yang mampu tumbuh dalam keadaan konsentrasi gula yang tinggi yang ditandai dengan tanda positif (+) yaitu isolat khamir KT012, KT013, KT311, KT312, KT313, KT614, KT2412, KT2413, KT2415, KT2417, KT4811, KT7211, KT721. 13 isolat yang dapat hidup pada media glukosa 50% menunjukkan bahwa isolat mampu tumbuh pada tekanan osmosis yang tinggi. Lasmini (2016) menyatakan bahwa ragi dengan kemampuan tumbuh pada media yang mengandung glukosa 50% menunjukkan ketahanan terhadap tekanan osmotik tinggi yang disebut juga dengan osmotoleransi. Bubnova dkk. (2014) mendefinisikan osmotoleransi sebagai kapasitas untuk

menahan peningkatan tekanan osmotik di lingkungan sekitar.



Gambar 4. Hasil Pengamatan Pertumbuhan Glukosa 50% a) KT012, b) KT2417, c) KT7214

Isolat khamir yang dipertimbangkan untuk dikembangkan sebagai isolat starter fermentasi terkontrol bagi kopi adalah isolat isolat khamir yang diisolasi pada waktu fermentasi 24 jam. Hal ini didasari, isolat yang tumbuh pada fermentasi 24 jam memiliki viabilitas yang baik terhadap perubahan nilai pH selama fermentasi, isolat ini dapat tumbuh baik dengan kondisi asam yang tinggi, pH yang rendah isolat yang diperoleh pada waktu fermentasi 24 jam berada pada fase logaritmik, yaitu fase yang paling baik dalam perkembangan dan pembelahan sel khamir. Oleh karena itu, isolat yang akan diuji kemampuannya dalam menghasilkan *selulase* dan *pektinase* adalah 7 isolat.

Uji Aktivitas Enzim

Isolat yang diuji aktivitas enzimnya diisolasi dari fermentasi 24 jam. Isolat ini antara lain, KT24I1, KT24I2, KT24I3, KT24I4, KT24I5, KT24I6, KT24I7 Aktivitas enzim yang diuji yaitu *selulase* dan *pektinase* secara kualitatif. Data hasil pengamatan uji aktivitas enzim *selulase* dan enzim *pektinase* dapat dilihat pada Tabel 2.

1. Uji aktivitas enzim *selulase*

Isolat khamir ditumbuhkan pada media 1% CMC dan 1% PDA dalam tabung reaksi.

Analisis kualitatif aktivitas enzim selulase mengungkapkan bahwa media mengalami perubahan warna dari merah menjadi kuning setelah inkubasi (Gambar 5).

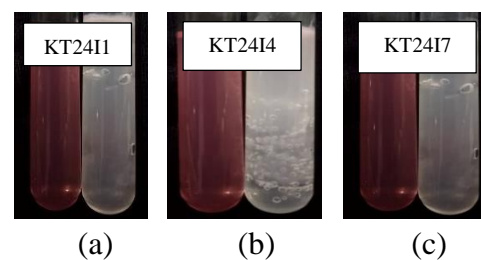
Tabel 2 Pengamatan uji aktivitas enzim *selulase* dan *pektinase*

Isolat	Enzim <i>selulase</i>	Enzim <i>pektinase</i>
KT24I1	+	-
KT24I2	+	-
KT24I3	+	+
KT24I4	+	+
KT24I5	-	+
KT24I6	+	-
KT24I7	+	+

Sumber : Hasil Analisis Data Penelitian, 2020

Hasil isolat yang menghasilkan enzim selulase ada 6 isolat yaitu KT24I1, KT24I2, KT24I3, KT24I4, KT24I6, dan KT24I7 (Tabel 2). Perubahan ini mengindikasikan bahwa isolat tersebut mampu menghasilkan enzim *selulase*. Selulase adalah enzim yang dikeluarkan oleh bakteri selolitik yang dapat memecah selulosa dalam makanan.

Kehadiran indikasi merah pekat bertanggung jawab atas rona merah yang terlihat di media. Anand dkk. (2009) menemukan bahwa conge red memiliki afinitas pengikatan khusus terhadap polisakarida melalui ikatan β -1,4-glikosidik.



Gambar 5. Hasil Uji Aktivitas Enzim *Selulase* a) KT24I1, b) KT24I4, c) KT24I7

Tabel 1. Hasil Pengamatan Identifikasi Khamir

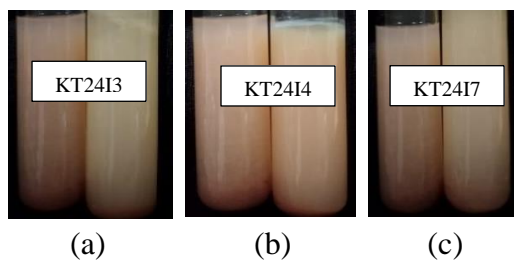
Isolat	Karakteristik Makroskopis					Karakteristik Mikroskopis	Uji Fermentasi Karbohidrat			Uji Glukosa 50%
	Bentuk	Warna	Elevasi	Permukaan	Tepian		Bentuk sel	Glukosa	Sukrosa	
KT011	Bulat	Putih susu	Timbul	Mengkilap	Rata	Bulat	+	-	-	-
KT012	Bulat	Putih kekuningan	Rata	Mengkilap	Halus	Bulat	+	+	-	+
KT013	Bulat	Putih susu	Rata	Mengkilap	Rata	Bulat	+	-	-	+
KT311	Bulat	Putih krem	Timbul	Mengkilap	Rata	Bulat	+	-	-	+
KT312	Bulat	Putih susu	Timbul	Mengkilap	Halus	Bulat	+	+	-	+
KT313	Bulat	Putih krem	Timbul	Mengkilap	Rata	Bulat	+	+	+	+
KT314	Bulat	Putih kekuningan	Rata	Mengkilap	Berombak	Bulat	+	+	-	-
KT611	Bulat	Putih susu	Timbul	Mengkilap	Rata	Bulat	+	-	-	-
KT612	Bulat	Putih krem	Timbul	Mengkilap	Rata	Bulat	+	-	-	-
KT613	Bulat	Putih susu	Timbul	Mengkilap	Rata	Bulat	+	-	-	-
KT614	Bulat	Putih kekuningan	Timbul	Mengkilap	Rata	Bulat	+	-	-	+
KT615	Bulat	Putih kecoklatan	Timbul	Mengkilap	Rata	Bulat	+	-	+	-
KT911	Bulat	Putih susu	Timbul	Mengkilap	Rata	Bulat	+	-	-	-
KT912	Bulat	Putih krem	Timbul	Mengkilap	Rata	Bulat	+	-	+	-
KT2411	Bulat	Putih susu	Timbul	Mengkilap	Rata	Bulat	+	-	-	-
KT2412	Bulat	Putih susu	Rata	Mengkilap	Rata	Bulat	+	-	-	+
KT2413	Bulat	Putih susu	Rata	Mengkilap	Rata	Bulat	+	-	-	+
KT2414	Bulat	Putih krem	Rata	Mengkilap	Rata	Bulat	+	+	-	-
KT2415	Bulat	Putih susu	Rata	Mengkilap	Rata	Bulat	+	+	-	+
KT2416	Bulat	Putih susu	Timbul	Mengkilap	Rata	Bulat	+	-	-	-
KT2417	Bulat	Putih kecoklatan	Timbul	Mengkilap	Rata	Bulat	+	-	+	+
KT4811	Bulat	Putih susu	Timbul	Mengkilap	Rata	Bulat	+	+	-	+
KT7211	Bulat	Putih susu	Timbul	Mengkilap	Rata	Bulat	+	+	+	+
KT7212	Bulat	Putih susu	Timbul	Mengkilap	Rata	Bulat	+	+	-	+

Sumber: Hasil Analisis Data Penelitian 2020

Tabel diatas menunjukkan keterangan karakteristik makroskopis, karakteristik mikroskopis serta uji fermentasi karbohidrat dari berbagai macam isolate Khamir.

2. Uji aktivitas enzim *pektinase*

Media yang digunakan dalam pengujian aktivitas enzim *pektinase* adalah media yang mengandung 1% pektin dan 1% PDA. Gambar 5 menunjukkan hasil uji kualitatif aktivitas enzim pektinase, dimana terjadi perubahan warna dari merah menjadi kuning pada media. Isolat khamir yang teridentifikasi menghasilkan pektinase, yaitu isolat KT24I3, KT24I4, KT24I6, dan KT24I7 (Tabel 2). Warna merah pada media disebabkan oleh adanya penambahan *conge red*. Keempat isolat khamir mampu menggunakan pektin dalam media sebagai satu-satunya sumber karbon untuk pertumbuhan *conge red* secara khusus mengikat polisakarida melalui ikatan β -1,4-glikosidik. Media uji dalam penyelidikan ini mengandung pektin polisakarida. Pektinase merupakan enzim yang disintesis oleh bakteri pektinolitik dan memiliki kemampuan memecah pektin pada komponen makanan. Adanya warna merah menandakan adanya pektin yang tidak terhidrolisis dan produksi Kongo. Kehadiran pektin merah terlihat (Anand *et al.*, 2009).



Gambar 6. Hasil Uji Aktivitas Enzim *Pektinase* a) KT24I3, b) KT24I4, c) KT24I7

Hasil uji aktivitas enzim selulase dan pektinase secara kualitatif menunjukkan bahwa terdapat tiga isolat khamir yang mampu menghasilkan enzim selulase dan pektinase, yaitu isolat khamir KT24I3, KT24I4, KT24I7. Ketiga isolat ini direkomendasikan untuk dikembangkan sebagai starter fermentasi terkontrol pada biji kopi.

Simpulan

Isolat khamir yang diisolasi dan diidentifikasi selama fermentasi spontan biji kopi Robusta Pada penelitian ini sebanyak 24 isolat. Umumnya isolat khamir berwarna putih dengan elevasi rata dan menonjol, permukaan mengkilat, dan tepi rata. Hasil uji fermentasi sumber karbon menunjukkan bahwa seluruh isolat menunjukkan fermentasi glukosa, 9 isolat menunjukkan fermentasi sukrosa, 5 isolat menunjukkan fermentasi laktosa, dan 13 isolat menunjukkan sifat osmofilik dengan tumbuh subur pada media glukosa 50%. Enzim selulase dan pektinase dari isolat khamir hasil fermentasi 24 jam diuji, dan hasilnya menunjukkan bahwa isolat KT24I3, KT24I4, dan KT24I7 mampu menghasilkan enzim tersebut, sehingga ketiga isolat ini direkomendasikan dalam pengembangan sebagai starter fermentasi terkontrol biji kopi

Daftar Pustaka

- Ali, A., Mohammed, S. 2014. "Optimization of Yeast Extract Production for Enhanced Growth of *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Microbiological Methods*, 98(3)
- Anand, Vennison, Sankar, Prabhu, Vasan, Raghuraman, Geoffrey, dan Vendan. 2009. Isolation and Characterization of Bacteria from the Gut Of *Bombyx Mori* that Degrade Cellulose, Xylan, Pectin and Starch and Their Impact on Digestion. *J of Insect Science*. 10(107): 1-20.
- Anggrayeni Tri Yesti, Wijanarka, Endang Kusdiyanti, 2019. Isolasi dan Identifikasi Morfologi serta Biokimia Khamir Hasil Isolasi dari Buah Tomat (*Lycopersicum esculentum*) yang Berpotensi

- menghasilkan Bioetanol. *Bioma*, Vol 21 (1)
- Atlas, R.M. 2004. *Buku Pegangan Media Mikrobiologi*. CRC Press. Jakarta
- Bubnová, M., Zemančíková, J., And Sychrová, H. 2014. Osmotolerant Yeast Species Differ In Basic Physiological Parameters And In Tolerance Of Non-Osmotic Stresses. *Yeast* 31: 309–321.
- Evangelista, S.R., Gabriela, M.C.P.M., Souza, C.C., Ferreira, C.S., Carla, A.M.P. and Freitas R.S. 2014. Inoculation of starter cultures in a semi-dry coffee (*Coffea arabica*) fermentation process. *Journal of Food Microbiology*. 44: 87-95.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Harley, J. P. And L. M. Prescott. 2002. *Laboratory Exercise In Microbiology*. 5th edition. New York : McGraw-Hill Education.
- Khususiyah N, Janudianto, Isnurdiansyah, Suyanto and Roshetko JM .2012. *Agroforestry and Forestry in Sulawesi series: Livelihood strategies and land use system dynamics in South Sulawesi*. Working paper 155. Bogor, Indonesia: World Agroforestry Centre (ICRAF) Southeast Asia Regional Program.
- Kurtzman, C.P., and Fell. 2011. *The Yeast A Taxonomy Study. Biodiversity and Ecophysiology of Yeast*. Springer-verlag, Berlin.
- Lasmini, T. 2016. Isolasi Dan Identifikasi Khamir Penghasil Asam Indol Asetat Dari Rhizosfer Anggrek Tanah *Pecteilis Susannae* (L.) Rafin. *Jurnal Ipteks Terapan*
- Lin, C.C (2010). Approach of Improving Coffee Industry in Taiwan Promote Quality of Coffee Bean by fermentation. *The Journal Of Internasional Management studies* 5 (1)
- Maturin L, Peeler JT. 2001. Aerobic Plate Count. In: *Bacteriological Analytical Manual* Online. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Washington DC (US): US Food and Drug Administration.
- Murthy, P. & Naidu, M.M (2011). Improvement of Robusta Coffee Fermentattion with Microbial Enzyme. *European Journal of Applied Sciences*. Vol 3 (4)
- Okwulehie, Cyriacus, I., and Alfred, N.K. 2010. Fungi associated with deterioration of sour-sop (*Anona muricata*. Linn) fruits in Abia State, Nigeria. *African J. of Microbiology Reaserch*.
- Setya, K. A. (2013). *Parasitologi: Praktikum Analisis Kesehatan*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC
- SNI. (2006). Penentuan Angka Lempeng Total pada Produk Perikanan. Badan Standarisasi Nasional. Jakarta.
- Suprihatin. (2010). *Pengaruh Faktor Lingkungan terhadap Pertumbuhan Khamir pada Proses Fermentasi*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Rahardjo, Pudji. 2012. *KOPI: Panduan Budi Daya dan Pengelolaan Kopi Arabika dan Robusta..* Jakarta: Penebar swadaya.
- Subandi. 2014. *Ilmu Dakwah : Pengantar kearah Metodologi*. Bandung : Syahida.